

# VU Research Portal

## Toward immune intervention in MS

Verbeek, R.

2007

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Verbeek, R. (2007). *Toward immune intervention in MS*. [PhD-Thesis – Research external, graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# Toward immune intervention in MS



Richard Verbeek

VRIJE UNIVERSITEIT

## TOWARD IMMUNE INTERVENTION IN MS

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad Doctor aan  
de Vrije Universiteit Amsterdam,  
op gezag van de rector magnificus  
prof.dr. L.M. Bouter,  
in het openbaar te verdedigen  
ten overstaan van de promotiecommissie  
van de faculteit der Geneeskunde  
op vrijdag 22 juni 2007 om 10.45 uur  
in het auditorium van de universiteit,  
De Boelelaan 1105

door

**Richard Verbeek**

geboren te Haarlem

promotor: prof. dr. C.D. Dijkstra  
copromotor: dr. J.M. van Noort



## **Toward immune intervention in MS**

Abstract in English

### **Towards immune intervention in MS**

The aim of the studies described in this thesis was to modulate the immune responses that are believed to be involved in MS. This is a disease that is characterized by inflammation of the CNS resulting in neuronal dysfunction. Local inflammatory lesions contain T cells, macrophages and monocytes and are accompanied by the production of cytokines and chemokines.

In our research group, we hypothesize that the myelin-associated protein  $\alpha$ B-crystallin plays a key role in the CNS inflammatory disease MS. This notion is based on studies that have shown that  $\alpha$ B-crystallin is the dominant antigen in MS-affected myelin for human T cells. In both patients and healthy subjects a strong peripheral  $\alpha$ B-crystallin reactive memory T-cell response exists qualifying it as a potential autoimmune target in MS. Also, as shown in this thesis, readily detectable antibody levels exist in human serum that are selectively directed at  $\alpha$ B-crystallin. These results indicate that there is not an unusual peripheral immune response in MS but rather a local CNS problem causing local inflammation. Thus, our present view of the immune responses that take place in MS is that they consist of a combination of a pre-existing peripheral T-cell response to  $\alpha$ B-crystallin together with increased expression and presentation of  $\alpha$ B-crystallin due to local CNS inflammation. Although  $\alpha$ B-crystallin-reactive-T cells as such are not considered as the primary cause of CNS inflammation, they are believed to aggravate such inflammation to clinically overt levels. This would be consistent with the apparent lack of differences between the T-cell and antibody repertoires of MS patients on the one hand and of healthy controls on the other.

An animal model that combines a pro-inflammatory T-cell response against  $\alpha$ B-crystallin and local CNS inflammation is still lacking. Therefore, commencing our study of immune modulatory methods, we first developed an animal model that combines both these immunological events. This combination is in line with our present views as to the relevant immune response in MS. CNS inflammation in animal models may be induced by immunization with myelin proteins, generating myelin-specific T cells. The presence of these T cells results in CNS damage in genetically susceptible mice. Despite extensive efforts, very few clinical or histological signs of CNS inflammation have been detected in rodents after immunization with  $\alpha$ B-crystallin. This is because these rodents are fully tolerant to  $\alpha$ B-crystallin in contrast to humans. Therefore, we used  $\alpha$ B-crystallin<sup>-/-</sup> mice to generate  $\alpha$ B-crystallin-specific T cells.

We first showed that transfer of  $\alpha$ B-crystallin reactive T cells obtained from  $\alpha$ B-crystallin<sup>-/-</sup> mice into MHC-compatible wildtype mice in the absence of any CNS

stress, did not induce any form of CNS inflammation. Hence these T cells are not encephalitogenic when present in the periphery even in large numbers. Yet, when recipient mice were infected with the neurotropic Semliki Forest virus followed by a transfer of  $\alpha$ B-crystallin-reactive T cells, these mice developed mild yet clear signs of acute EAE. In this model we confirmed that  $\alpha$ B-crystallin-reactive T cells alone are not encephalitogenic but become so when an expedient pro-inflammatory environment in the CNS promotes the influx of T cells and local functional presentation of  $\alpha$ B-crystallin to these T cells.

Mice deficient in  $\alpha$ B-crystallin themselves also turned out to be very useful in studying immune modulation of  $\alpha$ B-crystallin-specific immune responses. These mice developed a T-cell response against  $\alpha$ B-crystallin together with an antibody response against this protein. Such an antibody response is also detected in humans. In this thesis, antibody levels against  $\alpha$ B-crystallin of MS patients with and without uveitis were compared to healthy controls. The results showed that the established antibody levels are similar in MS patients and in healthy controls, meaning that they are a normal aspect of the adult human immune repertoire. Thus, both the antibody response and the T-cell response against  $\alpha$ B-crystallin that can be induced in  $\alpha$ B-crystallin<sup>-/-</sup> mice are representative for the human situation, making these mice very useful to test  $\alpha$ B-crystallin-specific immune modulation.

We further focused on different methods for modulating the immune response. First, various flavonoids were studied for their anti-inflammatory capacities *in vitro*. These studies provide new evidence for an important role of certain flavonoids as anti-inflammatory compounds in reducing T-cell proliferation and the production of inflammatory cytokines. The T cells used were obtained from mice and from humans. Mouse-derived T cells were reactive to the peptide 139-151 of the myelin protein PLP. Human-derived T cells were reactive to  $\alpha$ B-crystallin. We found markedly reduced activation of antigen-specific T cells *in vitro*. The structurally related flavonoids luteolin and apigenin were especially potent inhibitors of both proliferation and IFN- $\gamma$  production by antigen-specific T cells. This was observed with both mouse and human antigen-specific T cells. This inhibition by flavonoids was very promising and we therefore subsequently examined whether flavonoids may also reduce a pro-inflammatory T-cell response *in vivo* using the model of EAE in SJL mice. Upon immunization with PLP<sub>139-151</sub>, these mice develop both acute and subsequent chronic signs of EAE, which is known to be primarily mediated by T cells. Reduction of the T-cell response *in vivo* would therefore be expected to lessen clinical signs. Indeed, when mice were fed with luteolin, apigenin or morin, the proliferative T-cell reactivity was reduced. Yet, to our surprise, recovery from inflammation in actively induced EAE was reduced by two



## Summary

---

out of four flavonoids tested. Curcumin, the only food component used that was not a flavonoid, had mild beneficial effects in reducing the inflammation. Reduced recovery from EAE was even more pronounced when PLP<sub>139-151</sub>-specific T cells, isolated from flavonoid-fed mice, were transferred into untreated recipient mice. These mice developed clinical signs of EAE and showed also a clearly reduced recovery from the acute inflammation.

Another way to influence the immune response is by using probiotics. Probiotics are live microbial food supplements that, in contrast to most other bacteria, exert health benefits for the host in having anti-inflammatory properties not only in the gastrointestinal tract but also in the periphery. Probiotics most likely exert their immune-modulating effects by altering DC function. The effects of probiotics on DC were studied, primarily in order to find markers that can predict whether the selected probiotics species may be beneficial for use in vivo. As a first step, the expression levels of Toll-like receptors (TLR) on DC under influence of probiotics were explored. TLR shape the adaptive immune response that is mediated by DC, by direct recognition of pathogens. Also, surface markers and cytokine production by DC were monitored after probiotic stimulation. Probiotic-stimulated DC reduced the expression of TLRs 1, 2, 4 and 6 and increased the expression of TLRs 7-9, as compared to unstimulated DC. Also, DC displayed increased expression of the antigen-presenting molecule HLA-DR and the costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86. Therefore, the strains used are indeed capable of activating the DC which will be of relevance to direct and polarize the T-cell response.

A more specific approach in immune modulation is targeting the antigen-specific response. As discussed,  $\alpha$ B-crystallin reactive T cells are not primarily responsible for the pathogenesis of MS but they are considered a major driving force that aggravates and maintains local inflammation in the CNS. Abrogation of the peripheral  $\alpha$ B-crystallin-specific T-cell response is therefore expected to reduce inflammation in MS. We studied tolerance induction specific for  $\alpha$ B-crystallin in  $\alpha$ B-crystallin<sup>-/-</sup> mice. This study showed that a strong established T-cell response against  $\alpha$ B-crystallin can be reduced by at least 80% after intravenous administration of  $\alpha$ B-crystallin. The established tolerance was antigen specific, rapidly induced and the reduced response remained present for a period of at least 18 weeks. Tolerance induction as developed in mice proved highly effective and can be potentially very useful as a therapeutic approach in MS.

## **Op weg naar immuun interventie in MS**

Nederlandse samenvatting

### **Multiple sclerosis en de rol van $\alpha$ B-crystalline**

Multiple sclerosis is een chronische ontstekingsziekte van het centraal zenuwstelsel (CZS), dat bestaat uit de hersenen en ruggenmerg. Het is een van de meest invaliderende ziekten onder jonge volwassenen en wordt veelal geconstateerd tussen de leeftijd van 20 en 30 jaar. De ziekte komt wereldwijd voor en alleen al in Nederland lijden rond de 16.000 mensen aan MS. De ziekte wordt gekarakteriseerd door ontstekingshaarden in het CZS waarbij myeline, een isolerende laag rondom zenuwbanen die de geleiding van prikkels bevordert, het doelwit is van afweercellen. De plaatsen waar het myeline beschadigd is, worden laesies genoemd. Ten gevolge van deze laesies wordt de overdracht van zenuwprikkels verminderd. In gevorderde stadia kunnen de zenuwbanen zelf worden aangetast waardoor de overdracht van prikkels geheel stopt. In alle stadia kunnen de ontstekingen leiden tot een vermindering van een aantal lichaamsfuncties wat zich kan uiten in onder andere slecht zicht, spraakproblemen, evenwichts- en coördinatie problemen en vermoeidheid. Helaas is de oorzaak van MS tot op heden onduidelijk. De geografische spreiding van MS wijst erop dat genetische factoren een rol spelen in combinatie met omgevingsfactoren zoals virussen en bacteriën bij het risico op het ontwikkelen van MS.

Bij het ontstaan en de voortgang van de ontstekingen in MS speelt het immuunsysteem een belangrijke rol. Het immuunsysteem is een complex netwerk van gespecialiseerde cellen en organen dat als doel heeft ons lichaam te beschermen tegen een grote variëteit aan (gevaarlijke) ziekteverwekkende organismen (pathogenen) zoals virussen, bacteriën, schimmels en parasieten. Echter, het immuunsysteem kan zich ook ten kwade keren tegen het lichaam zelf. Lichaamseigen structuren worden dan aangevallen. Dit wordt ook wel een auto-immuunreactie genoemd. Veelal wordt gedacht dat in MS een auto-immuunreactie aan de orde is. In de laesies zijn grote aantallen cellen van het immuunsysteem aanwezig. Echter, een pathogeen zoals een virus of bacterie is niet aantoonbaar aanwezig in het CZS. De afwezigheid van een pathogeen suggereert dat de aanwezige cellen van het immuunsysteem blijkbaar tegen iets anders zijn gericht. In dit geval tegen structuren van het CZS. T cellen, specifieke cellen van het immuunsysteem die normaal gesproken gericht zijn tegen gevaren van buitenaf, herkennen kennelijk componenten (eiwitten) van myeline. Na herkenning van hun specifieke eiwit activeren de T cellen andere cellen, de macrofagen, die schade aanbrengen aan het myeline.

Om te achterhalen tegen welk eiwit of welke eiwitten in myeline de T cellen reageren, zijn deze cellen gestimuleerd met myeline afkomstig uit hersenen aangedaan met MS en met myeline uit gezonde hersenen. Uit dit onderzoek,

eerder uitgevoerd binnen TNO, bleek dat T cellen zeer sterk reageren tegen één enkel eiwit uit MS aangedane hersenen. Nader onderzoek wees uit dat dit eiwit  $\alpha$ B-crystalline was. Uit dit onderzoek bleek ook dat T cellen afkomstig van MS patiënten of gezonde personen even hard tegen dit eiwit reageren. Dit suggereert dat  $\alpha$ B-crystalline in grote mate voorkomt in MS aangedane hersenen en dat de immuun reactiviteit tegen dit eiwit in MS patiënten en gezonde personen niet verschilt. Naast de T cel reactiviteit is ook de antilichaam reactie tegen  $\alpha$ B-crystalline in MS patiënten in vergelijking met gezonde personen nader onderzocht. Een antilichaam is een eiwit dat door het immuunsysteem wordt geproduceerd om het lichaam te beschermen tegen de aanwezigheid van vreemde stoffen (antigenen). Ook hier bleek dat de antilichaam reactie in MS patiënten en gezonde personen niet wezenlijk verschillend is. Dit is beschreven in hoofdstuk drie van dit proefschrift. Het immuunsysteem van MS patiënten lijkt daarom heel vergelijkbaar met dat van gezonde personen. Deze bevinding geeft aan dat het probleem van de ontstekingen eerder in het CZS moet worden gezocht dan in het immuunsysteem. Echter, hoewel de T cellen gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline niet de primaire oorzaak zijn van de ontstekingen, verergeren deze cellen wel de ontsteking. Als deze immuunreactiviteit kan worden verminderd of weggenomen, zullen ook de ontstekingen verminderen.

Gewapend met de hierboven beschreven kennis komen we nu tot het doel van dit proefschrift. Het doel van de studies beschreven in dit proefschrift was om de immuun reacties waarvan wij denken dat die relevant zijn in de ziekte MS te beïnvloeden en te veranderen. Met name de immuunreactie tegen  $\alpha$ B-crystalline speelt een belangrijke rol in deze studies.

### **Proefdieren als model voor ontstekingen in het CZS**

Het gebruik van proefdieren is onontbeerlijk als het gaat om het onderzoeken van immuunreacties in een levend wezen (*in vivo*). Voornamelijk worden muizen en ratten gebruikt als model voor CZS-ontstekingen. Door een ontstekingsreactie op te wekken tegen myeline eiwitten ontwikkelen deze dieren ontstekingen in het CZS, die leiden tot verlamningsverschijnselen vergelijkbaar met de ziekteverschijnselen in MS. Dit ziektemodel wordt experimentele auto-immuun encefalomyelitis (EAE) genoemd. Het idee dat bij MS auto-immuunreacties van belang zijn komt voort uit dit diemodel.

Aangezien wij denken dat immuunreacties gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline een belangrijke rol spelen in MS zou het logisch zijn deze respons ook in muizen op te wekken met het gevolg dat deze muizen EAE ontwikkelen. Vervolgens kan dan worden onderzocht hoe de immuunreactie en de ontwikkeling van de ziekte kan

worden bestreden. Helaas blijkt dat het in muizen en ratten niet mogelijk is een immuunreactie tegen  $\alpha$ B-crystalline op te wekken. Anders dan bij de mens blijken deze dieren van nature tolerant te zijn voor  $\alpha$ B-crystalline, net als overigens de meeste andere zoogdieren. Dit wil zeggen dat het immuunsysteem geen T cel reactie ontwikkelt tegen dit eiwit. Om toch de afweerreacties in muizen te kunnen bestuderen wordt gebruik gemaakt van een handige ingreep in de muis. Door een genetische aanpassing kan worden voorkomen dat  $\alpha$ B-crystalline in de muis aanwezig is. Doordat het eiwit in het lichaam niet aanwezig is, wordt het door het immuunsysteem gezien als een vreemd en potentieel gevaarlijk eiwit en kan een immuunreactie worden opgewekt. Om deze reden wordt in de studies die in dit proefschrift beschreven zijn, veel gebruik gemaakt van deze zogenaamde  $\alpha$ B-crystalline deficiënte muizen. We kunnen in deze muizen een immuunreactie tegen  $\alpha$ B-crystalline opwekken.

Samengevat, in de  $\alpha$ B-crystalline deficiënte muizen vindt er geen ontsteking plaats van het CZS, immers het eiwit komt niet voor in het lichaam. Omgekeerd, normale muizen kunnen geen immuunreactie ontwikkelen tegen  $\alpha$ B-crystalline maar hebben juist wel weer  $\alpha$ B-crystalline in het CZS. Om toch een situatie te creëren die vergelijkbaar is met de situatie in de mens worden de T cellen gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline uit de  $\alpha$ B-crystalline deficiënte muizen geïsoleerd en overgebracht naar normale muizen. Op deze manier hebben we met wat ingrepen een muis verkregen waarbij zowel een immuunreactie tegen  $\alpha$ B-crystalline aanwezig is door het overbrengen van T cellen en waarbij  $\alpha$ B-crystalline in het CZS aanwezig is hetgeen van nature voorkomt in normale muizen.

De ontwikkeling van dit muismodel met  $\alpha$ B-crystalline staat beschreven in hoofdstuk 2. In dit hoofdstuk wordt onderzocht hoe T cellen gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline een ontsteking in het CZS kunnen veroorzaken. Zoals hierboven besproken is het immuunsysteem van MS patiënten en gezonde personen grotendeels hetzelfde. In hoofdstuk 3 van dit proefschrift wordt dit nogmaals benadrukt (hierover later meer). Waarom leidt dan de aanwezigheid van deze specifieke T cellen in sommige mensen tot ontstekingen en bij anderen niet? Vergelijkbaar met de mens leidt de aanwezigheid van deze cellen in een gezonde muis niet tot ontstekingen in het CZS terwijl  $\alpha$ B-crystalline wel aanwezig is. Echter, als het overbrengen van deze T cellen wordt vooraf gegaan door een virusinfectie, die de status-quo in de hersenen verandert, kunnen de cellen wel schade toebrengen aan de hersenen en ziekteverschijnselen zoals verlammingen veroorzaken. Hoogstwaarschijnlijk komt dit doordat de T cellen worden aangetrokken door de milde ontstekingshaarden veroorzaakt door het virus. Deze T cellen herkennen dan  $\alpha$ B-crystalline in het CZS. Deze studie suggereert dat de

aanwezigheid van T cellen gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline niet de aanleiding is voor het ontstaan van CZS-schade maar dat deze cellen een ontsteking wel op gang kunnen brengen. De studie uit hoofdstuk 2 levert geen bewijs dat een virusinfectie bij het ontstaan van ontstekingen in het CZS van MS patiënten betrokken is maar suggereert wel dat het immuunsysteem normaal functioneert. Het komt alleen in actie bij een voorafgaande verandering van het milieu in het CZS. Echter, het aantal keren dat ziekteverschijnselen zich voordeden was te variabel om dit muismodel te gebruiken voor het doel van dit proefschrift, namelijk het beïnvloeden van de immuunreactiviteit.

Naast het opwekken/activeren van T cellen gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline zijn de  $\alpha$ B-crystalline deficiënte muizen zelf ook zeer geschikt gebleken om als diemodel dienst te doen in de studies beschreven in dit proefschrift. De muizen ontwikkelen naast een T cel reactie tegen  $\alpha$ B-crystalline ook een antilichaam reactie. Deze opgewekte immuunreactiviteit tegen  $\alpha$ B-crystalline is vergelijkbaar met de immuunreactie in de mens. Deze antilichaam respons wordt namelijk ook gevonden in MS patiënten en gezonde personen zoals is beschreven in hoofdstuk 3. In de studie beschreven in dit hoofdstuk wordt de antilichaam reactiviteit tegen  $\alpha$ B-crystalline van MS patiënten vergeleken met dat van gezonde personen. Als hoofdconclusie blijkt uit dit onderzoek dat de reactiviteit van de antilichamen ook niet wezenlijk verschilt tussen de verschillende groepen. Bij elkaar genomen is de immuunreactiviteit tegen  $\alpha$ B-crystalline in de  $\alpha$ B-crystalline deficiënte muis representatief voor de immuunreactiviteit tegen  $\alpha$ B-crystalline zoals deze wordt gevonden in de mens. Dit gegeven maakt deze muis goed bruikbaar als diemodel voor het testen van antigeen-specifiek gerichte methodes die het immuunsysteem veranderen.

### **Moduleren van de immuunreactie in MS**

De volgende hoofdstukken van dit proefschrift behandelden de vraagstelling of en hoe het immuunsysteem kan worden veranderd of beïnvloed zodat ontstekingen in het CZS worden geremd.

Als eerste wordt in hoofdstuk 4 de ontstekingsremmende werking onderzocht van flavonoïden. Flavonoïden vormen een grote familie van plantaardige stoffen die voorkomen in voedingsmiddelen waaronder bijvoorbeeld thee en rode wijn. Deze zijn bekend om hun anti-oxidatieve werking en beïnvloeding van een groot aantal processen die plaats vinden in diverse soorten cellen, waaronder de cellen van het immuunsysteem. Flavonoïden kunnen door hun bijzondere eigenschappen de activatie en groei van potentieel schadelijke T cellen verminderen en de productie van ontstekingsbevorderende eiwitten (cytokines), die eenmaal geproduceerd de

functie en eigenschappen van een dezelfde of een andere cel beïnvloeden, onderdrukken. Als eerste zijn de positieve eigenschappen van diverse soorten flavonoïden onderzocht in een kweekstelsel (*in vitro*). Hiervoor werden T cellen gericht tegen myeline eiwitten gestimuleerd met het eiwit waarop ze reageren in de aanwezigheid van diverse soorten flavonoïden. Twee verschillende flavonoïden, namelijk apigenine en luteoline, remden de toename van het aantal cellen door celdeling (proliferatie) van menselijke T cellen en van T cellen afkomstig uit muizen. Ook de productie van het oplosbare boodschapper eiwit IFN- $\gamma$  van deze cellen was geremd. De remming van proliferatie was minder aanwezig bij gebruik van andere flavonoïden (quercetine en fisetine) hoewel deze wel de IFN- $\gamma$  productie remden. Deze resultaten waren veelbelovend voor vervolgstudies.

De volgende stap was om te onderzoeken of deze positieve eigenschappen ook weer terug gevonden kunnen worden *in vivo* (in een levend systeem). Dit staat beschreven in hoofdstuk 5. In dit hoofdstuk zijn de positieve effecten onderzocht van flavonoïden en curcumine, een ander plant product, op de ontwikkeling van CZS-ontstekingen in muizen (EAE). De ziekte kan actief worden opgewekt in muizen of passief worden opgewekt door geactiveerde T cellen over te brengen van zieke dieren naar gezonde dieren. In een normaal verlopend EAE ontwikkelen muizen ziekteverschijnselen waarvan zij ook weer herstellen. Onder invloed van flavonoïden verliep de ziekte anders dan werd verwacht op basis van de *in vitro* resultaten. Als eerste werd de proliferatie van de geactiveerde T cellen bekeken nadat muizen met flavonoïden waren gevoerd. Vergelijkbaar met de *in vitro* resultaten was de toename van T cellen door celdeling verminderd maar de IFN- $\gamma$  productie door deze cellen was verhoogd. Toen deze T cellen werden overgebracht naar gezonde dieren ontwikkelden deze dieren normale verschijnselen van EAE maar herstelden minder snel van de ziekte.

In actief opgewekte EAE, verminderden de flavonoïden ook het herstel maar in mindere mate. Het enige voedselcomponent dat een positieve werking had op het verloop van EAE was curcumine. Alles bij elkaar, hebben flavonoïden blijkbaar geen positieve werking op het verloop van EAE en verminderen zelfs het herstel van de ziekte.

Een andere manier om het immuunsysteem te beïnvloeden is met probiotica. Probiotica zijn bacteriën die voorkomen in het maag-darmstelsel en een positieve invloed hebben op de gezondheid. Hoe deze probiotica hun positieve invloed uitoefenen is nog grotendeels onbekend. Een mogelijkheid is dat de probiotica cellen beïnvloeden die vreemde stoffen (antigenen) aanbieden aan T cellen en deze activeren. Dendritische cellen (DC) zijn zulke antigeen presenterende cellen. DC zijn beslissend in het sturen van de immuunreactiviteit. Onder invloed van

probiotica kunnen deze cellen in de darm wel eens een sturend effect hebben op de immuunreactiviteit en de balans in activatie van verschillende typen afweerreacties beïnvloeden. In DC zitten Toll-like receptoren (TLR) die direct structuren van de probiotica herkennen. De signalen die de DC ontvangen van de probiotica hebben invloed op de hoeveelheid TLR in de DC en kunnen die laten toe- of afnemen in aantal. De DC worden door de probiotica ook gestimuleerd om signalen naar de omgeving af te geven. Dit gebeurt wederom door de hoeveelheid van de bepaalde eiwitten die gebonden zijn aan het oppervlak van de DC, zoals MHC-II, CD80, CD86, te laten toe- of afnemen. Dit gebeurt in combinatie met de uitscheiding van oplosbare boodschappereiwitten zoals IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  en TGF- $\beta$ , die invloed hebben op de functie en eigenschappen van dezelfde of andere cellen.

In hoofdstuk 6 onderzoeken we hoe verschillende stammen van probiotica al deze factoren beïnvloeden. Dit was een voorbereidend onderzoek naar de vraag of en hoe DC worden beïnvloed door probiotica. Uit deze studie is gebleken dat probiotica TLR2 en niet TLR4 activeren. TLR2 herkent voornamelijk peptidoglycanen die voorkomen in de celwand van probiotica. Onder invloed van probiotica worden TLR1, TLR2, TLR4 en TLR6 verlaagd en worden TLR 7, TLR8 en TLR 9 verhoogd aangemaakt. Dit ging gepaard met een verhoogde aanmaak van eiwitten gebonden aan het oppervlakte van de cel zoals MHC-II, CD80, CD86 en CD40, wat duidt op een activatie van de DC, en de productie van diverse oplosbare eiwitten. Concluderend kunnen we op dit punt zeggen dat probiotica de DC beïnvloeden maar we kunnen nog niet voorspellen in welke richting de immuunreactiviteit zich onder invloed van probiotica ontwikkelt. Daarvoor is meer onderzoek nodig.

In eerder genoemde hoofdstukken werd het immuunsysteem op een brede manier beïnvloed met de nadruk op T cellen of DC. Het laatste hoofdstuk behandelt hoe specifiek T cellen gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline kunnen worden aangepakt. T cellen gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline (het antigeen) veroorzaken niet de ziekte MS maar zijn wel de stuwende kracht om lokale ontstekingen te handhaven en te verergeren. Door nu doelgericht alleen deze cellen uit het immuunsysteem te verwijderen kunnen de ontstekingen in MS worden verminderd. In hoofdstuk 7 bestuderen we hoe T cellen gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline op dusdanige manier kunnen worden gemanipuleerd dat deze cellen niet meer reageren op stimulatie met  $\alpha$ B-crystalline, ofwel ze zijn getoleriseerd. Hiervoor gebruiken we de  $\alpha$ B-crystalline deficiënte muizen. Zoals beschreven kunnen deze muizen een immuunreactie tegen  $\alpha$ B-crystalline ontwikkelen. Drie weken nadat deze muizen een immuunreactie hebben ontwikkeld, werd zeer zuivere en schone  $\alpha$ B-crystalline intraveneus toegediend. Dit



resulteerde in een verlaging van de T cel activiteit met maar liefst 85%. De tolerante staat van de T cellen was antigeen specifiek, de cellen waren zeer snel na toediening van  $\alpha$ B-crystalline tolerant en de cellen bleven dit zeker 18 weken lang. In tegenstelling tot de T cel activiteit namen de hoeveelheden antilichamen (IgG1, IgG2a en IgG2b) specifiek voor  $\alpha$ B-crystalline toe. In conclusie, de T cellen specifiek gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline kunnen worden uitgeschakeld. Deze methode kan in potentie een goede methode zijn om de immuun reacties tegen  $\alpha$ B-crystalline in MS patiënten te remmen.

### Conclusies

Samenvattend kan worden gesteld dat:

- T cellen gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline een belangrijke rol kunnen spelen bij het verergeren van ontstekingen in het CZS als daar een bepaald ontstekingsbevorderend milieu aanwezig is (hoofdstuk 2);
- zowel de T cel respons als de antilichaam respons gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline een normaal fenomeen is in MS patiënten en gezonde personen. Deze immuunreactiviteit gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline kan ook worden opgewekt in  $\alpha$ B-crystalline deficiënte muizen. Dit maakt dit diermodel een goed model om immuunmodulerende methodes te bestuderen (hoofdstuk 2 en 3);
- flavonoïden *in vitro* een grote potentie hebben om een ontstekingsremmende werking te hebben. Echter *in vivo* blijken flavonoïden onvoorziene effecten te hebben die ze minder geschikt maakt om in hoge doseringen te gebruiken in (auto)immuun ziekten (hoofdstuk 4 en 5);
- probiotica dendritische cellen kunnen activeren en in potentie de mogelijkheid hebben om de immuunreactiviteit te beïnvloeden;
- $\alpha$ B-crystalline specifieke tolerantie inductie in muizen zeer effectief is in het uitschakelen van de T cel gericht tegen  $\alpha$ B-crystalline. In potentie is deze methode een goede manier om antigeen specifieke therapie te gaan toetsen in MS patiënten.